

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 05 SEP 2000
WIPO
PCT/FR 00/02076

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

FR⁰⁰/02076

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 27 JUIL. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

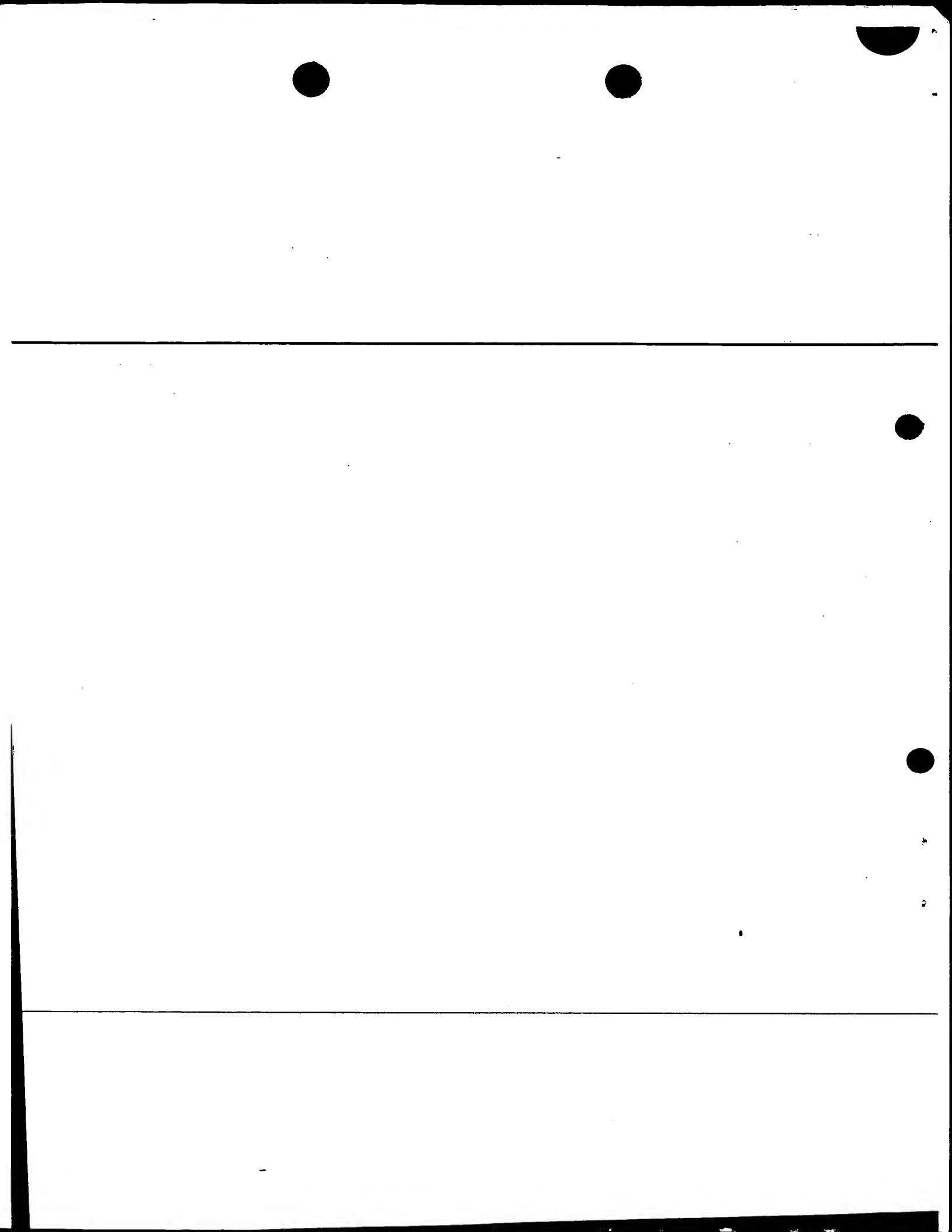
Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

ETABLISSEMENT PUBLIC NATIONAL

CRÉE PAR LA LOI N° 51-444 DU 19 AVRIL 1951



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **20 JUIL 1999**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9909406**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**
DATE DE DÉPÔT **20 JUIL. 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET LAVOIX
2 Place d'Estienne d'Orves
75441 PARIS CEDEX 09

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☐ demande initiale

☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

REF 98/0555

53-20-14-20

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Acides nucléiques codant pour des peptides possédant l'activité biologique de la sorbine.

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

- 1) INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM)
- 2) SOCIÉTÉ DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES (SCRAS)

Nationalité (s)

1) Française, 2) Française

Adresse (s) complète (s)

- 1) 101 Rue de Tolbiac, 75013 PARIS
- 2) 51/53 rue du Docteur Blanche 75016 PARIS

Pays

FR
FR

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

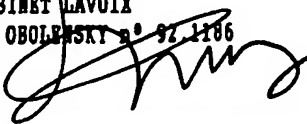
(nom et qualité du signataire)

CABINET LAVOIX

M. OBOLENSKY n° 92.1186

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI





DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 09406

TITRE DE L'INVENTION : Acides nucléiques codant pour des peptides possédant l'activité biologique de la sorbine

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

1) INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)

2) SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES

1) 101 Rue de Tolbiac, 75013 PARIS FRANCE

2) 51/53 rue du Docteur Blanche 75016 PARIS FRANCE

Désignent en tant qu'inventeurs :

WAHBI Kamal

2141 Grande rue

01700 MIRIBEL FRANCE

DESCROIX-VAGNE Monique

5 ruelle de la Bussière

69450 ST CYR AU MONT D'OR FRANCE

PANSU Danielle

1352 Route de Chilly

39570 MESSIA SUR SORNE FRANCE

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 23 Décembre 1999

~~CABINET LAVOIX~~

M. MONCHENY n° 92.1179

N. Moncheny

La présente invention concerne les acides nucléiques codant pour des peptides possédant l'activité biologique de la sorbine, les peptides ainsi codés et leurs applications thérapeutiques.

5 La sorbine est connue comme étant un peptide de 153 acides aminés et de 17500 Da, isolé et purifié à partir de l'intestin grêle de porc (Vagne-Descroix et al, Eur. J. Biochem, 1991, 201: 53-59, et demande de brevet WO89/06241). Une des activités biologiques connues de cette molécule consiste en une augmentation de l'absorption d'eau et d'électrolytes (comme
10 les ions chlorures et sodium) au niveau de l'intestin et de la vésicule biliaire (Charpin et al, Gastroenterology, 1992, 103: 1568-1573). Par ses propriétés sur l'absorption, la sorbine peut être utilisée de manière avantageuse en thérapeutique, notamment dans le traitement des diarrhées, des malabsorptions chroniques ou de certains troubles électrolytiques.

15 Afin de produire à grande échelle de la sorbine active, le clonage de la séquence nucléotidique codant pour ce peptide était indispensable. Or, jusqu'à présent, ce clonage n'avait pu aboutir, en raison de difficultés particulières liées à la structure du peptide et à sa faible expression.

En effet, le site actif de la sorbine est situé dans la partie C-
20 terminale de la séquence, qui est une région insensible à l'action de la trypsine et de la chymotrypsine et à l'oxydation. La séquence protéique de la sorbine telle que déterminée par séquençage automatique après purification, contient de nombreux acides aminés codés par des codons dégénérés avec seulement 4 méthionines. Le clonage d'une séquence codante à partir de la séquence
25 d'acides aminés correspondante connue nécessite le choix d'amorces oligonucléotidiques pour la technique de réaction en chaîne par la polymérase (PCR). Le degré de dégénérescence des amorces étant exceptionnellement élevé dans le cas du clonage de la sorbine, le nombre théorique de séquences susceptibles d'être obtenues à partir de ces amorces était de l'ordre de $6 \cdot 10^{24}$.

30 En outre les auteurs de la présente invention ont dû faire face au problème de la faible expression de la sorbine dans les tissus normaux, due au très petit nombre de cellules endocrines et à la rareté des ARNm.

Les auteurs de l'invention sont à présent parvenus à cloner le gène de la sorbine, notamment chez le porc et l'homme.

La présente invention a donc pour objet un acide nucléique codant pour un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine, ledit acide
5 nucléique comprenant la séquence nucléotidique choisie parmi :

a) la séquence SEQ ID n° 1 ;

b) la séquence SEQ ID n° 3 ;

c) une séquence nucléotidique homologue de la séquence SEQ ID n° 1 ou n° 3 ; et

10 d) au moins un fragment nucléotidique desdites séquences a), b) ou c).

La séquence SEQ ID n°1 représente la séquence d'ADNc codant pour la sorbine porcine.

15 La séquence SEQ ID n°3 représente la séquence d'ADNc codant pour la sorbine humaine, obtenue à partir d'ARN de gros intestin normal par RT-PCR.

La présente invention a également pour objet un acide nucléique comprenant la séquence SEQ ID n° 5. Cette séquence représente une
20 séquence d'ADNc obtenue à partir d'ARN d'une tumeur intestinale par RT-PCR. Elle est cependant également présente dans le tissu humain normal. On parlera préférentiellement de forme courte pour la séquence d'ADNc SEQ ID n° 3 et de forme longue pour la séquence d'ADNc SEQ ID n° 5. Un long fragment inconnu est inséré dans la forme longue en amont du site d'amidation
25 et des six derniers acides aminés de la région C-terminale. Les homologues et les fragments de cette forme longue sont également compris dans la présente invention.

Par "séquence nucléotidique homologue", on entend toute
~~séquence nucléotidique qui diffère de la séquence SEQ ID n°1, SEQ ID n° 3~~
30 ou SEQ ID n° 5 par substitution, délétion, et/ou insertion d'un nucléotide ou d'un nombre réduit de nucléotides, à des positions telles que ces séquences nucléotidiques homologues codent pour des polypeptides homologues tels que définis ci-après.

De préférence, une telle séquence nucléotidique homologue est identique à au moins 75 % des séquences SEQ ID n° 1, n° 3 ou n° 5, de préférence au moins 85 %, de préférence encore au moins 95 %.

De manière préférentielle, une telle séquence nucléotidique
 5 homologue hybride spécifiquement aux séquences complémentaires des séquences SEQ ID n° 1, n° 3 ou n° 5, dans des conditions stringentes. Les paramètres définissant les conditions de stringence dépendent de la température à laquelle 50% des brins appariés se séparent (T_m).

Pour les séquences comprenant plus de 30 bases, T_m est définie
 10 par la relation : $T_m = 81,5 + 0,41(\%G+C) + 16,6 \log(\text{concentration en cations}) - 0,63(\% \text{formamide}) - (600/\text{nombre de bases})$ (Sambrook et al, Molecular Cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989, pages 9.54-9.62).

Pour les séquences de longueur inférieure à 30 bases, T_m est
 15 définie par la relation : $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$.

Dans des conditions de stringence appropriées, auxquelles les séquences aspécifiques n'hybrident pas, la température d'hybridation est approximativement de 5 à 30°C, de préférence de 5 à 10°C en dessous de T_m , et les tampons d'hybridation utilisés sont de préférence des solutions de
 20 force ionique élevée telle qu'une solution 6xSSC par exemple.

Par « fragment nucléotidique », on entend tout fragment des séquences SEQ ID n° 1, SEQ ID n° 3 ou SEQ ID n° 5 ou des séquences nucléotidiques homologues de ces dernières, qui code pour un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine.

25 Par "activité biologique de la sorbine", on se réfère notamment à l'activité connue et mesurable de la sorbine sur l'absorption de l'eau et des électrolytes. L'activité de la sorbine peut être notamment mesurée par la diminution de poids d'une vésicule biliaire isolée, remplie de solution de Krebs
 (~~Data for Biochemical Research, Dawson RWC, Elliott D, Elliott WH, Jones KM.,~~

30 Oxford at Clarendon Press, (1959)) et plongée dans cette solution nutritive de Krebs, la diminution du poids traduisant une absorption du contenu hydrique de la vésicule biliaire. Cette diminution de poids est accentuée pour les vésicules traitées par rapport aux témoins.

L'activité de la sorbine peut être mesurée également par la disparition des électrolytes, notamment des ions Na^+ et Cl^- à partir d'une anse intestinale ligaturée *in situ* chez un rat anesthésié, remplie avec une solution de concentration connue. La disparition des ions après un temps donné traduit
5 l'absorption de ces ions de la lumière intestinale vers le milieu intérieur.

Une activité antisécrétoire de la sorbine peut être également mesurée avec le modèle ci-dessous au cours de la stimulation de la sécrétion intestinale par le peptide vasoactif intestinal ou par la toxine cholérique. La sorbine provoque en effet une diminution des sécrétions d'eau, des ions Na^+ et
10 Cl^- dans ce modèle (Marquet et al, 1994 ; Grishina et al, 1995 ; Marquet et al, 1998).

L'activité biologique de la sorbine étant portée par la forme amidée, les fragments nucléotidiques d'intérêt sont donc avantageusement les fragments comprenant les codons correspondant au site d'amidation Gly-Arg-
15 Arg.

Parmi les fragments d'intérêt, on peut citer notamment les fragments nucléotidiques comprenant les séquences SEQ ID n° 6 à 8, codant pour les peptides amidés de séquences d'acides aminés SEQ ID n° 9 à 11 respectivement.

20 Les différentes séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences d'ADN ou d'ARN, obtenues par criblage de banques de séquences au moyen de sondes élaborées sur la base de la séquence SEQ ID n° 1, n° 3 ou n° 5. De telles banques peuvent être préparées par des techniques classiques de biologie
25 moléculaire, connues de l'homme de l'art.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage des banques.

30 Les séquences nucléotidiques de l'invention permettent la réalisation de sondes nucléotidiques, hybridant spécifiquement avec une séquence SEQ ID n° 1, n° 3 ou n° 5 selon l'invention. Les conditions d'hybridation appropriées correspondent aux conditions de température et de

force ionique usuellement utilisées par l'homme du métier, de préférence dans des conditions stringentes telles que définies précédemment. De telles sondes font également partie de l'invention. Elles peuvent être utilisées comme outil de diagnostic *in vitro* pour la détection, par des expériences d'hybridation, notamment d'hybridation "*in situ*", de transcrits spécifiques des polypeptides de l'invention dans des échantillons biologiques ou pour la mise en évidence de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques résultant d'un polymorphisme, de mutations ou d'un mauvais épissage.

Les sondes de l'invention comportent au minimum 10 nucléotides, et de préférence au moins 14 nucléotides, préférentiellement au moins 20 nucléotides, préférentiellement encore au moins 50 nucléotides, et au maximum comportent la totalité de la séquence nucléotidique SEQ ID n° 1, n° 3 ou n° 5 ou de leur brins complémentaires.

Préférentiellement, les sondes de l'invention sont marquées, préalablement à leur utilisation. Pour cela, plusieurs techniques sont à la portée de l'homme du métier comme par exemple le marquage fluorescent, radioactif, chimioluminescent ou enzymatique.

Les méthodes de diagnostic *in vitro* dans lesquelles ces sondes nucléotidiques sont mises en oeuvre pour la détection de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques, telles que la perte d'hétérozygotie et le réarrangement génique, au niveau des séquences nucléiques codant pour un peptide de l'invention, sont incluses dans la présente invention.

L'invention a aussi pour objet un procédé de détection de l'expression de la sorbine dans un échantillon cellulaire ou tissulaire, comprenant les étapes consistant à :

- préparer l'ARN dudit échantillon ;
- mettre en contact ledit ARN obtenu avec une sonde ayant une séquence nucléotidique capable de s'hybrider spécifiquement avec un acide nucléique codant pour un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine, tel que défini précédemment ;

- détecter la présence d'ARNm hybridant avec cette sonde, indicatrice de l'expression d'un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine dans l'échantillon.

L'invention a aussi pour objet un procédé de détection de l'expression de la sorbine dans des cellules ou un tissu par hybridation *in situ*, comprenant les étapes consistant à:

~~- mettre en contact lesdites cellules ou ledit tissu avec une sonde~~
ayant une séquence nucléotidique capable de s'hybrider spécifiquement avec un acide nucléique codant pour un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine, tel que défini précédemment ;

- détecter la présence d'ARNm hybridant avec cette sonde, indicatrice de l'expression du peptide possédant l'activité biologique de la sorbine.

Les sondes d'ADNc de l'invention sont en outre avantageusement utilisables pour la détection d'anomalies chromosomiques.

Les séquences nucléotidiques de l'invention sont également utiles pour la fabrication et l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques sens et/ou antisens pour des réactions de séquençage ou d'amplification spécifique selon la technique dite de PCR (réaction en chaîne par la polymérase) ou toute autre variante de celle-ci.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention ont par ailleurs des utilisations dans le domaine thérapeutique, pour la réalisation de séquences antisens, capables de s'hybrider spécifiquement avec une séquence d'acide nucléique, y compris un ARN messenger, utilisables en thérapie génique. L'invention a ainsi pour objet des séquences antisens capables d'inhiber, au moins partiellement, la production de sorbine, telle que définie précédemment. De telles séquences sont avantageusement constituées par celles qui constituent le cadre de lecture codant pour la sorbine au niveau du transcrit.

30 Parmi les amorces ou sondes oligonucléotidiques d'intérêt, on peut notamment citer les oligonucléotides comprenant les séquences SEQ ID n° 12 à SEQ ID n° 20 ou leurs séquences complémentaires.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent en outre être utilisées pour transformer des cellules cibles et leur faire exprimer un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine.

L'invention a donc également pour objet une composition
5 pharmaceutique comprenant un acide nucléique selon l'invention codant pour un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable, ladite composition étant destinée à
être utilisée en thérapie génique. L'acide nucléique d'intérêt, de préférence inséré dans un vecteur, peut être administré sous forme nue ou en association
10 avec au moins un agent facilitant la transfection dudit acide nucléique.

A partir des séquences d'ADNc clonées, les auteurs de la présente invention ont pu en déduire la séquence d'acides aminés des peptides codés par ces séquences d'ADNc.

La séquence SEQ ID n°2 est la séquence d'acides aminés de la
15 sorbine porcine.

La séquence SEQ ID n°4 est la séquence d'acides aminés de la sorbine humaine de forme courte, codée par la séquence nucléotidique SEQ ID n° 3 obtenue à partir d'ARN de gros intestin normal par RT-PCR.

Les auteurs de la présente invention ont comparé la séquence
20 protéique de la sorbine porcine traduite à partir de l'ADNc (SEQ ID n°2) avec la séquence de la sorbine obtenue par séquençage protéique (WO 89/06241). Il s'est avérée que la séquence de la sorbine disponible jusqu'à présente, obtenue par séquençage protéique (automatique ou manuel), contenait des erreurs. Les corrections sont les suivantes : remplacement W16T et
25 remplacements D35K et W112R.

La présente invention a donc pour objet un peptide recombinant possédant l'activité biologique de la sorbine et comprenant la séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID n° 2, SEQ ID n° 4 et
SEQ ID n° 11.

30

Sont également compris dans l'invention les peptides homologues des peptides de séquence SEQ ID n°2 ou n°4.

Par « peptide homologue », on entend tout peptide ayant une séquence d'acides aminés qui diffère des séquences SEQ ID n°2 ou n°4 par substitution, délétion et/ou insertion d'un acide aminé ou d'un nombre réduit d'acides aminés, à des positions telles que ces modifications ne portent pas
5 significativement atteinte à l'activité biologique de la sorbine. Est exclu de cette définition des peptides homologues, le peptide ayant la séquence obtenue par séquençage automatique tel que représenté figure 1.

Lesdites substitutions sont de préférence des substitutions conservatives, c'est-à-dire des substitutions d'acides aminés de même classe,
10 tels que des substitutions d'acides aminés aux chaînes latérales non chargées (tels que l'asparagine, la glutamine, la serine, la thréonine, et la tyrosine), d'acides aminés aux chaînes latérales basiques (tels que la lysine, l'arginine, et l'histidine), d'acides aminés aux chaînes latérales acides (tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique) ; d'acides aminés aux chaînes latérales
15 apolaires (tels que la glycine, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, la méthionine, le tryptophane, et la cystéine).

De préférence, une telle séquence d'acides aminés homologue est identique à au moins 85 %, de préférence au moins 95 % des séquences SEQ ID n° 2 ou n°4.

20 L'homologie est généralement déterminée en utilisant un logiciel d'analyse de séquence (par exemple, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Des séquences d'acides aminés similaires sont alignées pour obtenir le maximum de degré d'homologie (i.e. identité). A cette fin, il peut être nécessaire d'introduire de manière artificielle
25 des espaces (« gaps ») dans la séquence. Une fois l'alignement optimal réalisé, le degré d'homologie (i.e. identité) est établi par enregistrement de toutes les positions pour lesquelles les acides aminés des deux séquences comparées sont identiques, par rapport au nombre total de positions.

30

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent par ailleurs être utilisées pour la production de polypeptides recombinants possédant l'activité biologique de la sorbine tels que précédemment définis.

Ces polypeptides peuvent être produits à partir des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, selon des techniques de production de produits recombinants connues de l'homme du métier.

5 Selon un mode de réalisation de l'invention, la séquence nucléotidique peut être insérée dans un vecteur d'expression, dans lequel elle ~~est liée de manière opérante à des éléments permettant la régulation de son~~
expression, tels que notamment des promoteurs et/ou terminateurs de transcription.

10 Les signaux contrôlant l'expression des séquences nucléotidiques (promoteurs, activateurs, séquences de terminaison...) sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à
15 réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi. De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple l'électroporation ou la précipitation au phosphate de calcium.

20 Les vecteurs de clonage et/ou d'expression tels que décrits ci-dessus, contenant une des séquences nucléotidiques définies selon l'invention font également partie de la présente invention. On peut utiliser notamment le vecteur Blue Script SKII (Stratagene) et le vecteur λ gt 11 (Stratagene).

25 L'invention vise en outre les cellules hôtes transfectées, de manière transitoire ou stable, par ces vecteurs d'expression. Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes, procaryotes ou eucaryotes, d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que
~~défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions~~
30 permettant la réplication et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

Les cellules hôtes selon l'invention sont utilisables dans un procédé de production de peptide recombinant possédant l'activité biologique de la sorbine, ledit procédé comprenant les étapes consistant à :

5 i) insérer une séquence nucléotidique telle que définie précédemment dans un vecteur d'expression, ladite séquence nucléotidique étant liée de manière opérante avec des éléments permettant la régulation de son expression ;

ii) transformer une cellule hôte avec le vecteur ainsi obtenu ;
iii) cultiver ladite cellule hôte dans des conditions permettant
10 l'expression de ladite séquence nucléotidique ;
iv) recueillir le peptide recombinant exprimé ;
v) éventuellement purifier ledit peptide ;
vi) éventuellement procéder à une amidation du peptide produit (dans le cas où la cellule hôte est une cellule procaryote).

15

L'étude des propriétés biologiques de la sorbine a mis en évidence son effet avantageux sur l'absorption de l'eau, des électrolytes et des nutriments par les muqueuses, en particulier les muqueuses digestives.

Les auteurs de l'invention ont montré que la séquence active de
20 ce peptide est spécifique de certains tissus, le duodénum, le jéjunum chez le porc, s'étendant à l'iléon et au côlon chez l'homme ainsi qu'à certaines régions du système nerveux central et périphérique.

La présence de la sorbine dans des tissus divers attribue à ce peptide et à ses fragments, un rôle dans le transport cellulaire des électrolytes,
25 et en particulier du chlore à tous les niveaux et en particulier du tractus digestif et du système nerveux central. Au niveau du système nerveux central, il intervient dans les troubles du comportement liés en particulier à un déséquilibre ionique.

Ces propriétés avantageuses s'accompagnent d'une grande
30 innocuité.

L'invention vise donc des compositions pharmaceutiques comprenant une quantité efficace d'au moins un peptide possédant l'activité

biologique de la sorbine tel que défini précédemment, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être notamment administrée par voie orale, parentérale, intraveineuse, 5 intramusculaire, sous-cutanée, percutanée ou par administration intra-nasale.

La préparation des compositions pharmaceutiques qui contiennent des principes actifs dissous ou dispersés dans ces dernières, est bien connue de l'homme du métier. Généralement, ces compositions sont préparées sous la forme de solutions ou de suspensions injectables. 10 Cependant, elles peuvent aussi être sous des formes solides appropriées pour préparer des solutions, ou des suspensions extemporanément. Les préparations peuvent aussi être émulsifiées.

Les modes d'administration, les posologies et les formes galéniques des compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être 15 déterminés de manière usuelle par l'homme du métier, notamment selon les critères généralement pris en compte pour l'établissement d'un traitement thérapeutique adapté à un patient, comme par exemple l'âge ou le poids corporel du patient, la gravité de son état général, la tolérance au traitement, et les effets secondaires constatés, etc.

20 Les compositions pharmaceutiques de l'invention comprenant un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine, ainsi que les compositions pharmaceutiques comprenant un acide nucléique codant pour un tel peptide, sont particulièrement utiles dans :

- 25 - le traitement des diarrhées infectieuses et des toxicoses aiguës du nourrisson par l'effet bénéfique d'une augmentation de l'absorption de l'eau et des électrolytes,
- le traitement adjuvant de la réanimation parentérale lors de la réinduction de l'alimentation entérale, au cours de maladies infectieuses, 30 d'interventions chirurgicales, en particulier sur la sphère digestive,
- le traitement de certaines malabsorptions chroniques par augmentation de l'absorption des glucides et des aminoacides liée à l'augmentation de l'absorption de l'eau et des électrolyses,

- le traitement de certains troubles électrolytiques et notamment ceux de la mucoviscidose, caractérisés par un trouble de la réabsorption des électrolytes au niveau des glandes sudoripares, salivaires, bronchiques, de l'intestin et du pancréas,

5 - le traitement des obésités et des surcharges hydriques par les dérivés substitués des polypeptides et peptides de l'invention qui suppriment l'absorption de l'eau, des électrolytes et des nutriments.

La présence de sorbine dans les fibres nerveuses pourrait permettre de qualifier la sorbine de peptide neurocrine. La co-localisation de la
10 sorbine avec des hormones et des neurotransmetteurs comme la sérotonine corrobore l'hypothèse d'un facteur peptidique neurocrine.

La séquence totale de la sorbine est de 153 acides aminés (459 nucléotides), représentant une faible partie du transcrit codant estimé entre 6,5 et 8 Kb, en Northern Blot. Cette différence de taille permet de supposer
15 que la sorbine fait partie d'un complexe protéique de type pré-pro-protéines. Un tel complexe existe dans la majorité des systèmes endocriniens, et en particulier pour le « Vasoactive Intestinal Peptide », VIP.

On pourrait aussi lui attribuer un effet intracrine. En effet, la séquence interne non impliquée dans l'effet physiologique principal de la
20 sorbine est riche en prolines et arginines. La présence des régions fortement riches en ces deux acides aminés est connue actuellement par son implication dans la fixation sur les domaines SH3 des tyrosines kinases. Dans ce cas la séquence interne de la sorbine pourrait servir d'adaptateur pour rapprocher la région active C-terminale de son site de fixation ou d'action.

25 Ces adaptateurs sont actuellement fortement recherchés pour compléter les mécanismes de transduction des signaux entre les sites de fixation et leurs effecteurs.

Le fait d'utiliser la région C-terminale seule (7 à 10 acides aminés C-terminaux) pourrait court-circuiter tout le mécanisme de transduction du
30 signal en agissant directement sur les pompes couplées à un récepteur.

L'invention a également pour objet un anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé spécifiquement contre la sorbine humaine, ou un fragment dudit anticorps capable de se lier spécifiquement à la sorbine humaine.

De manière préférentielle, les anticorps selon l'invention sont
 5 spécifiques de l'extrémité N-terminale et en particulier de la portion des acides aminés 40 à 45 de cette extrémité N-terminale de la sorbine humaine.

~~Des anticorps polyclonaux peuvent être obtenus à partir du~~
 sérum d'un animal immunisé contre la sorbine humaine selon l'invention selon les modes opératoires usuels.

10 Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus selon la méthode classique de culture d'hybridomes décrite par Köhler et Milstein (Nature, (1975), vol. 256, pp. 495-497).

Les anticorps ou fragments d'anticorps de l'invention sont par exemple des anticorps chimériques, des anticorps humanisés, des fragments
 15 Fab et F(ab')₂. Ils peuvent également se présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués. Par exemple, ils peuvent être associés à une toxine, telle la toxine diphtérique ou à un produit radioactif.

Les anticorps ainsi produits peuvent être notamment utilisés pour détecter et/ou doser la sorbine humaine dans tout échantillon biologique
 20 susceptible d'en contenir.

L'invention a donc également pour objet un procédé de détection et/ou de dosage immunologique de la sorbine humaine dans un échantillon biologique dans lequel :

i) on met en contact ledit échantillon biologique avec un anticorps
 25 tel que défini précédemment, marqué de manière détectable ;

ii) on observe la formation d'un complexe anticorps-sorbine humaine, indicateur de la présence de sorbine humaine dans ledit échantillon.

Les anticorps de l'invention peuvent donc être avantageusement
~~mis en œuvre dans toute situation où l'expression de la sorbine humaine doit~~
 30 être observée.

Les figures et exemples ci-dessous illustrent l'invention sans en limiter la portée.

LEGENDES DES FIGURES

5 - La figure 1 représente une comparaison entre la séquence protéique de la sorbine porcine traduite à partir de l'ADNc (haut) et la ~~séquence de la sorbine obtenue par séquençage protéique (bas)~~. Le degré d'homologie est présenté entre les deux séquences (milieu). Les modifications apportées sont : (W16T), (D35K), (W112R).

10 - La figure 2 représente une comparaison entre les séquences nucléotidiques de la sorbine porcine (haut) et humaine (forme courte, en bas). Les différentes variations de séquences ont été confirmées par séquençage sur plusieurs clones issus de différents tissus du tube digestif humain.

15 - La figure 3 représente une comparaison des séquences protéiques de la sorbine humaine (haut) et porcine (bas) traduite à partir de l'ADNc.

 - La figure 4 représente des coupes de tumeur carcinoïde de l'intestin grêle exprimant à la fois la protéine et les transcrits de la sorbine :

20 a) Révélation des cellules immunoréactives à l'anticorps Ac 93-128 YC-17,T5. Révélation à la diamino benzidine. Les cellules positives sont localisées dans la couche périphérique du nodule tumoral.

25 b) Hybridation *in situ* utilisant la sonde G C4-C3 antisens, ayant la séquence nucléotidique 316-459 de la sorbine porcine (nucléotides 316 à 459 de SEQ ID n° 1). Sonde marquée à la digoxigénine. Révélation streptavidine-biotine, chromogène AEC. Les sites d'hybridation sont nombreux et ils sont observés dans des cellules qui contiennent de la sorbine.

 - La figure 5 représente des coupes de jéjunum humain normal.

30 a) Hybridation *in situ* utilisant la sonde G (C4-C3 antisens). Sonde ~~marquée à la digoxigénine. Révélation streptavidine-biotine, chromogène AEC.~~
Certaines cellules des cryptes hybrident avec la sonde de la sorbine. Trois cellules marquées sont indiquées par trois flèches.

 b) Révélation des cellules immunoréactives à l'anticorps Ac 93-128 YC-17,T5. Révélation à la diamino benzidine des coupes adjacentes à

celles utilisées pour l'hybridation *in situ*. Une des cellules qui hybride est révélée par l'anticorps.

c) Hybridation *in situ* utilisant la sonde G (sens) comme témoin négatif. Sonde marquée à la digoxigénine.

5

EXEMPLES

EXEMPLE 1 :

Clonage du gène de la sorbine porcine

10

MATERIELS ET METHODES

Extraction des ARN totaux

15

L'isolement des ARN totaux est réalisé par la technique au guanidium thiocyanate (Chomczynski et al.1987) qui utilise des agents chaotropiques détruisant toutes les structures cellulaires et libérant les ARN nucléaires et cytoplasmiques, l'ADN et les protéines sont dénaturés. Une étape de purification est nécessaire, soit par ultracentrifugation, soit par

20

extraction au phénol-chloroforme.

Les ARN totaux sont extraits à partir de tissus secs congelés. Le tissu (1 gramme) sec congelé est broyé jusqu'à homogénéisation à l'aide d'un appareil Ultraturax en présence de 7,5 ml de solution de lyse.

25

Les homogénats sont déposés sur des coussins de chlorure de césium (CsCl 5,7 M et 2,4 M) et ultra-centrifugés pendant 16 heures à 30.10^3 rpm., à 20°C dans le rotor Beckman SW41.

30

Le culot translucide (contenant les ARN totaux) est repris dans 1ml d'eau distillée stérile, puis précipité avec 2,5 volume d'éthanol absolu. Le culot d'ARN est traité au DEPC 0,1% (diéthyl pyrocarbonate) à la concentration d'environ $2 \mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$.

Après calcul de la concentration des ARN, on réalise un contrôle qualitatif de l'extraction des ARN totaux par électrophorèse sur un grand gel d'agarose à 1% dans un tampon dénaturant de la manière suivante: 5 à 10 μg

d'ARN totaux sont dénaturés à 65°C pendant 5 minutes dans une solution contenant des agents dénaturants et du tampon MOPS (SIGMA). L'électrophorèse des ARN dénaturés est effectuée sur un grand gel horizontal d'agarose à 1% (contenant 6% de formaldéhyde) dans du tampon MOPS, sous une tension de 45 volts, à température du laboratoire pendant une nuit (Lehrach et al., 1977).

Technique de RT-PCR.

Devant la rareté des ARN messager de la sorbine et les difficultés pour les obtenir en quantités importantes, la technique d'amplification a été alors développée. Cependant, l'ARN ne pouvant pas lui-même servir de matrice pour la PCR, une étape de transcription inverse en ADN complémentaire a été nécessaire.

Le choix des amorces a été basé sur la présence des acides aminés les moins dégénérés de la séquence protéique de la sorbine, à l'aide d'un logiciel (OLIGO). Les séquences retenues sont SRB1(5')(AARGAYACNTAYAARAC) (acides aminés 14 à 19) et SRB 2 (3') (GGNCGYTCRTGYTGYAG)(acides aminés 142 à 147) car elles sont faiblement dégénérées et donnent une bande unique en PCR et RT-PCR : D'autres amorces non dégénérées ont été utilisées par la suite (tableau I).

Tableau I : Tableau contenant les amorces principales utilisées dans les RT-PCR.

SEQ ID	Désignation	Séquence	Orientation	Position
12	SRB1	AARGAYACNTAYAARAC	sens	42-57
13	S1	CGGCCGAAGGACTGGTA	sens	34-50
14	S2	ACAAGCCGAGATGATGAC	sens	83-99
15	S22	GTCTTCAACAGAAAAGCATGAC	sens	
16	SRB2	GGNCGYTCRTGYTGYAG	antisens	441-426
17	S4	GGATCCCAGTCATGCTT	antisens	341-325
18	S3	TGGATGACTTCCCAGGC	antisens	421-405
19	S48	GGGTCGTTTCGTGCTGCAGGATGGATGA CTTCCCAGGCTCGTATTCAA	antisens	441-394
20	C1	TGCTTGCGGTTTCGTGACGGG	antisens	459-439

5

Transcription inverse.

La quantité minimale d'ARN total nécessaire est de 1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

On prépare deux tubes Eppendorf de 1ml dont l'un contient l'amorce anti-sens (SRB 2) et l'autre l'amorce sens (SRB 1). On introduit dans chaque tube :

10

- 50 ng d'ARN total purifié,
- 2 μl (1/10 du volume total réactionnel) de tampon RT,
- 4 μl de dNTP (déoxyribonucléotides triphosphates),
- 1 μl d'amorce (50 $\text{pmol}.\mu\text{l}^{-1}$),
- eau distillée stérile,(qsp 18,5. μl).

15

L'ARN total est dénaturé par chauffage des tubes 6 min. au bain-marie 70°C, puis mis directement dans la glace. Après centrifugation 1 min. à 13.10³ trs.min.⁻¹, on ajoute dans chacun des tubes 0,5 μl de Rnasin et 1 μl de transcriptase inverse MMLV. Le volume total de la réaction est complété à 20 μl et incubé 1 heure à 42°C.

20

PCR

Après la transcription inverse, dans chaque tube on ajoute:

- 8 µl de tampon PCR,
- 4 µl de dNTP,
- 5 - 1 µl (50 pmol) de la seconde amorce,
- 0,5 µl de Taq polymérase,
- eau distillée stérile qsp 100 µl.

puis on ajoute deux gouttes d'huile minérale dans les tubes (pour éviter l'évaporation au cours de la réaction de PCR) et on introduit ceux-ci

10 dans le thermocycleur qui est programmé pour 35 cycles avec :

- programme 1 : => dénaturation de 10 min. à 95°C,
 dénaturation de 1 min.,
- programme 2 : => hybridation de 1 min. à 42°C,
 élongation de 1 min. à 72°C,
- 15 - programme 3 : => élongation de 10 min. à 72°C,
- programme 4 : => conservation à 4°C.

Contrôle de la RT-PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

20 à 2%.

On ajoute dans chaque tube 100 µl de chloroforme et on agite avec un Vortex pour émulsionner et éliminer l'huile minérale. On centrifuge 2 min. à 13.10^3 trs.min⁻¹, on récupère l'ADNc de chaque tube et on contrôle l'amplification sur un gel d'agarose à 2 %, avec un temps de migration de 20
25 min, à 100 volts et on observe le gel sous une lampe à rayon ultra violet à 254 nm.

Technique de sous-clonage.

~~La technique de sous-clonage a permis d'isoler et d'amplifier un~~
30 fragment d'ADN en très grande quantité de manière monoclonale. Trois étapes principales ont été utilisées :

- isolement de l'ADN à insérer,
- recombinaison *in vitro* avec un vecteur,

- introduction du vecteur recombiné dans une cellule hôte compétente.

Préparation du vecteur de clonage.

5 Le vecteur de clonage utilisé est le plasmide Bluescript II SK +/- (Stratagene). La technique de préparation du vecteur comprend plusieurs étapes :

* étape 1 : hétérodigestion par les enzymes de restriction Eco RI et Hind III en vue de linéariser le vecteur pour la recombinaison.

10 * étape 2 : purification.

* étape 3 : déphosphorylation des extrémités 5' par l'action d'une phosphatase, ceci afin d'éviter que le vecteur se religue sur lui-même.

* étape 4 : purification.

15 * étape 5 : contrôle de la déphosphorylation par transformation bactérienne sur gélose plus antibiotique. Si le vecteur est bien déphosphorylé, il n'y a pas d'expression plasmidique et aucune bactérie ne pousse.

Préparation de l'insert.

20 L'insert utilisé est l'ADNc obtenu par RT-PCR et isolé par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%.

Purification de l'insert par le Kit GeneClean (Ozyme).

Sous la lampe à ultra violet (254 nm), on découpe délicatement le gel d'agarose avec des scalpels propres pour chaque bande et on récupère une bande par tube Eppendorf (de 1,5 ml).

25 - On ajoute 2 volumes de solution de NaI et on place au bain-marie à 55°C pendant 5 min. L'utilisation du NaI permet de dissoudre l'agarose, d'augmenter la force ionique et, ainsi, de récupérer l'ADNc emprisonné par fixation des Na⁺ sur les phosphates de la molécule.

~~- On ajoute 10 µl de Glass Milk (Ozyme) (petits fragments de~~
30 silice sur lesquels se fixe l'ADNc par liaisons hydrogènes) et on laisse agir 5 min. à température du laboratoire.

- On centrifuge 30 secondes à 13.10^3 trs.min.⁻¹, on élimine le surnageant et on fait trois lavages successifs avec la solution de lavage NEW Wash (Ozyme) :

5 lavage I : - on ajoute dans chaque tube 1 ml de NEW Wash,
- on centrifuge 2 min. à 13.10^3 trs.min.⁻¹,
- on élimine le surnageant,

10 lavage II : - on ajoute 500 µl de NEW Wash,
- on centrifuge 2 min. à 13.10^3 trs.min.⁻¹,
- on élimine le surnageant,

lavage III : - identique au lavage II.

15 On sèche le culot contenant l'ADNc, on reprend l'ADNc sec avec 50 µl d'eau distillée stérile et on met les tubes Eppendorf 5 min. au bain-marie à 55°C. Le rôle de l'eau distillée est de décrocher l'ADNc fixé sur les fragments de silice car il n'y a plus de force ionique et la chaleur permet d'abaisser la force des liaisons hydrogène entre l'ADNc et le Glass Milk. Ainsi, l'ADNc est libéré.

20 - On vortexe et on centrifuge les tubes 1 min. à 13.10^3 trs.min.⁻¹ et on récupère l'ADNc pour l'hétérodigestion.

- Hétérodigestion par les enzymes de restriction Eco RI et Hind III.

25 On ajoute dans chaque tube :
- 10 µl de tampon B (tampon des enzymes de restriction),
- 2 µl d'enzyme Eco RI (à 20 unités),
- 2 µl d'enzyme Hind III (à 20 unités),
- eau distillée stérile qsp 100 µl du volume total réactionnel,
~~et on incube une nuit au bain-marie à 37°C.~~

30 On purifie de nouveau par le Kit GeneClean, puis on refait la même manipulation à partir de l'ajout de Nal.

L'hétérodigestion est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%, et l'insert est ligaturé avec le plasmide BlueScript (recombinaison *in vitro*).

On introduit dans chaque tube :

- 5 - (volume calculé) μ l d'ADNc,
 - 1 μ l de plasmide (50ng) BlueScript linéarisé et déphosphorylé,
 - 1 μ l de tampon T4 ADN ligase (à -20°C).
-
- 0,5 μ l d'enzyme T4 ADN ligase,
 - eau distillée stérile qsp 20 μ l de volume total réactionnel,
 - 10 et on laisse une nuit au bain-marie à 16°C .

Préparation des bactéries compétentes.

La souche bactérienne utilisée est : *Escherichia coli* souche HB101.

15

a) Préculture.

Sous la hotte à flux laminaire, on prélève, à l'aide d'une pipette Pasteur munie d'embout stérile, une goutte d'une souche bactérienne de culture congelée et on ensemence un tube de 4 ml de milieu de culture L.Broth (LB, Gibco-BRL). On incube une nuit à 37°C sous agitation.

20

b) Culture.

Sous la hotte, on ensemence 500 μ l de préculture dans un erlenmeyer de 250 ml de milieu de culture LB et on incube 2,30 heures, à l'étuve 37°C sous agitation. On contrôle régulièrement la croissance bactérienne par la mesure de la DO à 600 nm (environ toutes les 30 min.) car celle-ci ne doit pas dépasser la valeur 0,3 qui correspond à la phase de croissance exponentielle. (Généralement, cette valeur est atteinte au bout de 2,30 heures de culture).

25

~~Quand la DO = 0,3, on arrête la culture bactérienne en sortant~~
 30 l'erlenmeyer de l'étuve en le mettant dans la glace. En effet, au delà de cette DO, les cellules bactériennes rentrent dans une phase stationnaire qui n'est plus favorable à la transformation à cause des sécrétions de toxines et de la

mort cellulaire. Puis on centrifuge 15 min. à 3000 trs.min⁻¹ à 4°C pour obtenir un culot bactérien.

c) Traitement de la paroi bactérienne.

5 On élimine le surnageant par retournement du tube et on ajoute au culot:

~~20% d'une solution de Tris CaCl₂ glacé (préalablement filtrée).~~

Le tube est placé 20 min. dans la glace.

10 - On centrifuge 15 min. à 3000 trs.min⁻¹ à 4°C, on élimine le surnageant, et on ajoute 10% de Tris CaCl₂. Le tube est placé à 4°C.

Transformation bactérienne.

Sous la hotte, on prépare des tubes stériles de 5 ml contenant :

15 - 300 µl de bactéries compétentes,
- 10 µl de plasmides recombinants,
et on place les tubes dans la glace pendant 20 min.
- On fait un choc thermique en mettant les tubes 2 minutes dans un bain-marie à 42°C.

20 - On ajoute 500 µl de milieu LB par tube et on met 1 heure au bain-marie à 37°C.

- On ajoute 4 ml de milieu Top (LB de Gibco-BRL et Agar à 7 g/1000 ml de Difco-USA) en surfusion par tube et on étale chaque tube sur une boîte de pétri contenant de la gélose, préalablementensemencée avec de
25 l'ampicilline.

Analyse des clones recombinants.

~~Sous la hotte à flux laminaire, on prélève 10 colonies pour~~
30 chaque boîte et on les ensemence dans 4 ml de milieu LB. (auquel on a préalablement ajouté 40 µl d'ampicilline concentrée 100x). Le mélange est laissé incuber une nuit à l'étuve 37°C.

Réalisation d'une microamplification.

1 : extraction phénolique.

- On transvase le contenu de chaque tube amplifié dans des tubes Eppendorf qui sont centrifugés 2 min. à $13 \cdot 10^3$ trs.min.⁻¹ pour précipiter les bactéries.

- On aspire le surnageant avec une pipette Pasteur reliée à une pompe à vide et on ajoute 100 µl de phénol par tube, puis on vortexe. Ce traitement permet l'extraction de tous les acides nucléiques (ADN et ARN bactériens, et ADN recombinant) par dénaturation des protéines avec le phénol.

- On ajoute 100 µl de TNE (Tris Natrium EDTA, le Tris provenant de Boehringer, le sodium NaCl de Merck et l'EDTA de Merck), on vortexe 5 min. et on centrifuge 2 min. à $13 \cdot 10^3$ trs.min.⁻¹. L'EDTA permet d'inhiber les DNases et le sodium permet d'avoir une force ionique, le tout assure ainsi la conservation des acides nucléiques.

2 : précipitation éthanolique.

- On reprend 80 µl de surnageant de chaque tube dans de nouveaux Eppendorfs et on ajoute 2 volumes d'éthanol absolu à -20°C. On laisse 5 min. à -80°C.

- On centrifuge 10 min. à 4°C à $13 \cdot 10^3$ trs.min.⁻¹, on élimine le surnageant et on met le culot d'ADN recombinant à sécher.

3 : hétérodigestion de l'ADN recombinant par les enzymes de restriction Eco RI et Hind III.

On reprend le culot d'ADN recombinant avec 50 µl d'eau distillée stérile et on prépare des tubes Eppendorf.

Dans chaque tube on ajoute :

- 10 µl d'ADN,
- 2 µl de tampon B (tampon des enzymes de restriction),
- 1 µl d'enzyme Eco RI (10 unités),
- 1 µl d'enzyme Hind III (10 unités),

- eau distillée stérile qsp 20 μ l,
et on incube au bain-marie à 37°C pendant 1 heure.

**4 : contrôle de l'hétérodigestion par électrophorèse sur gel
5 d'agarose à 2 %.**

On ajoute 2 μ l de tampon de charge dans chaque tube et on charge le gel. Temps de migration : 30 minutes à 100 volts.

10 Réalisation d'une macroamplification.

Sous la hotte, chaque tube de mini-préparation positif est ensemencé dans des erlenmeyers de 1l contenant :

- 200 ml de milieu de culture LB.,
- 2 ml d'ampicilline 100x,
- 15 - 5 gouttes du tube de mini-préparation
et incubé une nuit à 37°C sous agitation.

1: digestion de la paroi bactérienne

- On transvase le contenu de chaque erlenmeyer dans des pots
20 spécifiques pour la centrifugeuse réfrigérante et on centrifuge 15 min. à 4000
trs.min.⁻¹ à 4°C. On élimine le surnageant, on ajoute 2 ml de solution I
(contenant du lysozyme) par pot, on homogénéise et on laisse agir 5 min. à
température du laboratoire.

- On ajoute 4 ml de solution II par pot, on agite pour avoir une
25 consistance visqueuse et on laisse agir 5 min. dans la glace.

- On ajoute 3 ml de solution III par pot, on homogénéise et on
laisse agir 15 min. dans la glace.

- On centrifuge 15 min. à 8000 trs.min.⁻¹ à 4°C, on filtre le
surnageant de chaque pot et on le transvase dans des tubes en verre.
-

30

2 : précipitation alcoolique.

- On ajoute 4,5 ml de 2-propanol par tube et on laisse 30 min. à -
80°C.

- On centrifuge 20 min. à $12500 \text{ trs.min}^{-1}$ à 4°C (en prenant soin de mettre les tubes dans des réducteurs de protection en caoutchouc), on élimine le surnageant et on égoutte les tubes sur du papier filtre.

- On sèche pour éliminer toutes traces d'alcool.

5

3 : digestion enzymatique.

- On reprend les culots d'ADN avec 3 ml d'eau distillée.

- RNase : on ajoute $10 \mu\text{l}$ de RNase par tube et on laisse agir 30 min. au bain-marie 37°C . Ici, la RNase permet la digestion de l'ARN bactérien.

10

- Protéinase K : on ajoute $10 \mu\text{l}$ de protéinase K par tube et on laisse agir 30 min. au bain-marie 37°C . Cette réaction enzymatique permet la digestion de toutes les protéines.

4 : Ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium.

15

Dans chaque tube, on ajoute :

- 3,75 g de CsCl (chlorure de césium),

- $1 \mu\text{l}$ de BET (bromure d'éthidium),

les tubes sont ultracentrifugés à $50.10^3 \text{ trs.min}^{-1}$ à 20°C pendant une nuit. On obtient alors un anneau d'ADN rose visible sous la lumière ultra violette.

20

- On récupère délicatement l'anneau d'ADN recombinant rose (dans des tubes de 10 ml) à l'aide d'une seringue, en piquant sous l'anneau et en aspirant doucement. On ajoute un volume d'eau distillée stérile par tube et on complète à 10 ml avec de l'alcool isoamylique. On homogénéise par des retournements énergiques pendant 3 min.

25

- On centrifuge 5 min. à $3000 \text{ trs.min}^{-1}$ à 15°C (afin d'éliminer tout le BET par l'alcool isoamylique) et on récupère les plasmides recombinants avec une pipette Pasteur munie d'une poire (on utilise une pipette par tube).

30

5 : précipitation éthanolique.

- On ajoute 2 volumes d'éthanol 100° et on laisse agir 30 min. à 80°C . (aspect laiteux des tubes).

6 : Lavages.

- On centrifuge 15 min. à 12500 trs.min⁻¹ à 4°C pour séparer le sel de l'ADN recombinant, on écarte le surnageant et on ajoute 2 ml d'eau distillée stérile pour éliminer le CsCl.

5 - On ajoute 2 volumes d'éthanol absolu froid (-20°C) pour précipiter l'ADN et on laisse agir 30 min. à -80°C.

~~On centrifuge 15 min. à 4°C à 12500 trs.min⁻¹, on élimine le surnageant et on égoutte les tubes sur le papier filtre.~~

- Les tubes sont séchés 10 min. au speed vac pour éliminer
10 toutes les traces d'éthanol et les culots secs sont repris avec 100 µl d'eau distillée stérile.

7 : dosage de l'ADN au spectrophotomètre à 260nm.**8 : séquençage selon la méthode de Sanger modifié.**

On prépare des tubes Eppendorf comme indiqué ci-après :

- 5 µl d'ADNc (insert à 1 µg.µl⁻¹)

(volume ajusté en fonction du dosage spectrophotométrique).

- 2 µl de NaOH à 2N,

20 - eau distillée stérile qsp 20 µl,

et on laisse 20 min. à température du laboratoire.

On neutralise par l'acétate de sodium puis on réalise une précipitation éthanolique :

On ajoute 75 µl d'éthanol absolu froid (-20°C), on laisse agir 20
25 min. à -80°C et on centrifuge à 13.10³ trs.min⁻¹. On sèche pour éliminer toute trace d'éthanol.

Hybridation :

Dans chaque tube, on ajoute :

30 - 2 µl de tampon d'hybridation (5X)

- 0,5 µl d'amorce (10 pmol.),

- 7,5 µl d'eau distillée stérile,

et on laisse 20 min. au bain-marie à 37°C.

Amorçage de la réaction de polymérisation :

On ajoute :

- 1 μ l de DTT,

- 2 μ l de tampon d'hybridation ("GTP labelling mix",

5 USB/Amersham (dilué 5X)),

- 0,5 μ l de ^{32}P -dATP,

1,5 μ l de sequenase (diluée au 1/6).

on homogénéise et on laisse agir 5 min. à température du laboratoire.

10 - On transfère 3,5 μ l de ce mélange dans 4 tubes Eppendorf contenant chacun un ddNTP (didéoxyribonucléotide) différent (4 réactions différentes), et on laisse agir 5 min. au bain-marie à 37°C. Ici, l'élongation des chaînes est arrêtée lors de l'incorporation des ddNTP car ceux-ci ne peuvent pas former de liaisons phosphodiester avec les dNTP suivants.

15 On arrête la réaction en ajoutant 5 μ l de solution "stop" (contenant un colorant et de la formamide, (Amersham)) par tube Eppendorf et on place immédiatement les tubes dans la glace.

Chargement du gel de polyacrylamide.

20 Les tubes sont chauffés à 80°C, puis placés immédiatement dans la glace. Le gel est chargé avec des dépôts de 2 à 4 μ l par puits. On laisse migrer 1,20 à 3 heures pour des fragments de 100 pb, à 1450 volts.

25 **Arrêt de l'électrophorèse, exposition et révélation par autoradiographie.**

a) Arrêt de l'électrophorèse.

30 Les électrodes sont débranchées, le tampon de migration est éliminé et les plaques de verre contenant le gel séquence sont retirées. Le gel est récupéré et une feuille de papier Watman® 3M est disposée sur celui-ci en tapotant pour bien le faire adhérer et le gel fixé sur le papier est déposé sur une feuille de film plastique (Cellofray®) pour le protéger. Le gel séquence est mis à sécher 2 heures à 80°C sous vide.

b) Exposition du gel sur un film autoradiographique.

Après séchage, le Cellofray® est retiré et un film autoradiographique (Hyper film-MP®, Amersham) est appliqué. Puis
 5 l'ensemble est disposé dans une cassette (munie d'un écran intensificateur) pour une exposition de une nuit à plusieurs jours à -80°C, car les films sont plus sensibles dans le froid.

c) Révélation du film autoradiographique.

10 La révélation se fait à la lumière rouge et consiste à passer le film autoradiographique dans différents bains :

- 2 min. dans le révélateur dilué au 1/5 (ILFORD 2000 RT),
- rinçage dans l'eau,
- 5 min. dans le fixateur dilué au 1/5 (ILFORD 2000 RT),
- 15 - 15 min. de rinçage à l'eau courante,
- séchage et lecture du film.

Préparation et marquage des sondes.

20

Marquage d'une sonde.

Pour détecter la présence d'une séquence complémentaire, par hybridation, au sein d'un mélange de fragments d'ADN, les sondes d'ADN dénaturées, sont marquées radioactivement au ^{32}P -dCTP (dans les conditions
 25 préconisées par le fournisseur), par la technique d'amorçage multiple ("random priming"). Les sondes obtenues ont une activité spécifique de 0,2 à 1.10^9 cpm. μg^{-1} .

On dénature 2 min. à 80°C, 30 ng de fragments d'ADNc pur
 (sonde) dans un volume final de 45 μl d'eau distillée stérile et on met le tout
 30 directement dans la glace.

- On introduit ensuite les 45 μl de sonde dénaturée dans un lyophilisat (Kit Rediprime DNA , USB) contenant :
- le tampon de la polymérase Klenow,

- les dNTP (moins le dCTP),
- les amorces octanucléotidiques de synthèse,
- la polymérase Klenow,

et on rajoute 5 µl de radioactivité ^{32}P -dCTP. On incube 10 min.

- 5 au bain-marie 37°C pour la polymérisation selon le principe de l'amorçage multiple ("random priming").

Hybridation moléculaire des sondes marquées avec une membrane.

10

Northern blot et Southern blot.

Le Northern blot est une technique permettant de détecter un transcrit au sein d'un mélange complexe. La taille de l'ARN peut être déterminée par le degré de sa migration dans le gel et son abondance par l'intensité de la bande (ou signal). Cette méthode est très utilisée pour étudier les anomalies de la transcription d'un gène. Elle se réalise en plusieurs étapes:

15

- transfert du profil électrophorétique sur une membrane de Nylon,

20

- préhybridation,
- hybridation,
- lavage,
- révélation par autoradiographie.

Transfert.

25

Après une électrophorèse réalisée avec 5 à 10 µg d'ARN total dénaturé (sur un gel dénaturant à 1% en agarose), on fait un transfert de ceux-ci sur un filtre de Nylon (Hybond N Amersham) en présence de tampon phosphate. Le transfert dure une nuit à température du laboratoire et se fait grâce au phénomène de capillarité.

30

Préhybridation et hybridation.

La membrane est séchée durant 3 heures à 80°C avant l'hybridation pour fixer l'ADN, de manière irréversible.

Dans un sac plastique scellé (contenant la membrane) on introduit 10 ml de solution d'hybridation avec 150 µl d'ADN de sperme de saumon dénaturé (2 min. à 80°C). On incube le sac 3 à 6 heures à 42°C sous agitation.

- 5 - Hybridation : On ouvre le sac avec précaution et on introduit 50 µl de sonde dénaturée (2 min. à 80°C) et marquée au ^{32}P -dCTP. On incube une nuit à l'étuve 42°C, sous agitation.
-

Lavages.

- 10 Après hybridation, le mélange est éliminé du sac plastique et le filtre est lavé dans différents bains :

- 1 rinçage rapide dans une solution de 2XSSC à température ambiante.
- 1 rinçage dans une solution de 2XSSC à 65°C durant 45 min.
- 15 - 1 rinçage de 45 min. à 65°C sous agitation dans une solution de 2XSSC + SDS 0,5 %.
- 1 rinçage de 45 min. à 65°C sous agitation dans une solution de 0,2XSSC + SDS 0,5 %.

20

Révélation par autoradiographie.

Le filtre est ensuite séché et exposé pour autoradiographie sur film (Hyper film-MP®, Amersham) dans une cassette avec un écran intensificateur. L'exposition dure de quelques heures à plusieurs jours à -80°C.

25

RESULTATS

- Les auteurs de la présente invention ont réalisé un criblage de la banque d'expression de cDNA sur le duodénum et le jéjunum de porc avec un antiserum anti sorbine. Ce criblage n'a pas permis de continuer la recherche
-
- 30 dans cette banque. En revanche, l'amplification par RT-PCR en présence d'amorces dégénérées dans les régions les moins dégénérées, s'est révélée positive en donnant plusieurs fragments amplifiés à partir d'ARN de jéjunum et de duodénum. Tous ces fragments ont été clonés, séquencés et comparés

avec les banques de données. Les auteurs de la présente invention ont fait varier les différents paramètres de la PCR pour optimiser la spécificité des amorces. Ceci a permis d'amplifier une partie de la séquence de la sorbine. Le fragment de la sorbine confirmé par séquençage a servi ensuite comme sonde
 5 pour cribler la banque d'expression réalisée à partir des même ARN. Plusieurs clones ont été purifiés et séquencés.

Le clonage de l'ADNc de la sorbine a permis de rectifier la séquence protéique de la sorbine, dans sa région N terminale (fig. 1).

10

EXEMPLE 2 :

Clonage du gène de la sorbine humaine

MATERIELS ET METHODES

15

Les conditions de PCR utilisées sont identiques à celles décrites dans l'exemple 1.

Le gène de la sorbine humaine a été isolé au moyen d'une sonde préparée à partir de l'ADNc complet (459 paires de bases) codant pour la
 20 sorbine porcine.

Au préalable, des études en immunohistochimie et en hybridation *in situ* ont été réalisées.

Immunohistochimie

25

Le protocole mis en œuvre est similaire à celui décrit dans l'article de Fatima Abou El Fadil, 1997.

L'antisérum utilisé, désigné 93-128 Y C17, a été produit par inoculation du peptide contenant les acides aminés 137 à 153 de la sorbine porcine auquel a été ajoutée une tyrosine en position 1, à un lapin, comme
 30 décrit dans l'article cité ci-dessus.

Hybridation *in situ*.

I - Principe de l'hybridation *in situ*.

L'hybridation *in situ* permet de visualiser un ARNm (transcrit d'un gène) au niveau cellulaire, soit sur des coupes histologiques, soit sur des suspensions cellulaires, par l'utilisation d'une sonde marquée (à chaud ou à froid). En effet, cette technique est basée sur la propriété d'appariement spécifique (avec une forte affinité) de deux séquences nucléotidiques complémentaires. Elle se déroule en 6 étapes :

- 10 * marquage de la sonde,
- * prétraitement,
- * hybridation,
- * lavages,
- * révélation,
- 15 * observations au microscope optique.

II- But de son utilisation.

L'intérêt de son utilisation dans le cas de l'étude de la sorbine, est de localiser au niveau cellulaire, l'ARNm correspondant à la sorbine sur des coupes histologiques de vipôme pancréatique, de pancréas sain et de carcinoïde intestinal, et par là-même, de confirmer le marquage nucléaire et immunocytoologique obtenu parallèlement. Pour cela, on utilise les sondes marquées à la digoxigénine-11-dUTP selon la méthode de l'amorçage multiple ("random priming").

25

III- Technique.

III-1- Marquage des sondes à la digoxigénine.

30 Il se fait par la méthode d'amorçage multiple avec le Kit Rediprime DNA. On réalise le marquage des sondes froides avec le dUTP-digoxigénine .

III-2- Préparation des lames.

- On lave les lames à l'eau du robinet, puis on les immerge une nuit dans de l'alcool chlorhydrique.

- On lave 3 à 4 heures dans l'eau courante, on rince à l'eau distillée et on sèche à l'étuve 40°C.

- On étale sur chaque lame une goutte de poly-L-lysine (à 1% diluée dans de l'eau distillée) à l'aide d'une autre lame comme un frottis. On fait sécher les lames à l'air (à l'abri de la poussière) et on les incube une nuit à l'étuve 60°C.

III-3- Préparation des coupes.

a) Traitement du bloc.

On fait des coupes sériées avec le pancréas sain, le vipôme et le carcinoïde intestinal. Celles-ci sont réalisées au microtome à 3-4 μm , avec un couteau jetable. Puis, elles sont recueillies sur les lames propres traitées à la poly-L-lysine, en déposant une goutte d'eau distillée stérile à la surface de celle-ci. Ensuite, on égoutte l'excès d'eau et on sèche 1 heure sur une platine chauffante. On incube les lames une nuit à l'étuve 60°C. Par la suite, on peut soit les traiter soit les conserver sur un portoir emballé dans de l'aluminium et mis à 37°C.

b) Déparaffinage et réhydratation des coupes.

But : débarrasser le tissu du milieu d'inclusion.

Technique : les coupes sont plongées dans des bains d'alcool de degré croissant :

- 3 fois 5 min. dans du xylène,
- 2 fois 2 min. dans l'éthanol 100°,
- 2 fois 2 min. dans l'éthanol 95°,
- réhydratées 2 fois 5 min. dans du PBS (phosphate buffer saline à 150 mmol.l⁻¹).

c) Prétraitements.

Ils servent essentiellement à améliorer le rapport signal/bruit de fond et la réponse d'hybridation. Il en existe un certain nombre dont :

5 * Hydrolyse chimique.

But : elle permet de dénaturer l'ADN pour rendre l'ARNm plus accessible à la sonde

Technique : On trempe les lames dans un bain-marie d'HCL 0,2N pendant 12 min. et on rince 2 fois 5 min. dans du PBS.

10 * Hydrolyse enzymatique à la protéinase K.

But : ce traitement permet la digestion de toutes les protéines, ce qui entraîne alors une perméabilisation du matériel et augmente la pénétration de la sonde dans le tissu.

15 **Technique** : les lames sont trempées dans 100 ml de protéinase K (à 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ dans du Tris EDTA pH 7,4) pendant 10 min. à 37°C.

* Blocage des peroxydases endogènes.

But : éviter l'interaction des peroxydases tissulaires avec l'utilisation de la streptavidine peroxydase biotinylée, lors de la révélation.

20 **Technique** : les lames sont plongées 5 min. dans H_2O_2 (à 3% dans du PBS) et rincées 2 fois 5 min. dans du PBS.

d) Contrôle par les RNases.

25 **But** : il s'agit de réaliser un témoin négatif qui permettra d'affirmer, lors de l'étude des résultats, que le signal observé sur les lames ne correspond pas à un artefact.

Technique : les lames sont plongées dans 100 ml de RNases (à 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ dans du 2XSSC) pendant 30 min. à 37°C et lavées dans du 2XSSC pendant 15 min. à température ambiante.

e) Déshydratation.

Technique : les coupes sont passées dans des bains d'alcool de degré croissant :

- 1 bain d'éthanol 70° pendant 1 min.,
- 1 bain d'éthanol 80° pendant 1 min.,
- 1 bain d'éthanol 100° pendant 10 min.,
- séchage à l'air libre.

III-4- Hybridation.

a)- Dénaturation de la sonde.

But : c'est une étape indispensable pour avoir des sondes monobrins car celles-ci obtenues par génie génétique, sont encore bicaténares (et ne peuvent donc pas être utilisées pour l'hybridation).

Technique : dans 20 µl de solution d'hybridation (préparée extemporanément), on ajoute la sonde pour obtenir 10 ng.ml⁻¹, on la met 5 min. à 75°C et on la plonge immédiatement dans la glace.

Remarque :

* La concentration de la sonde peut être ajustée en fonction de la longueur. Pour des sondes inférieures à 1Kb, la concentration peut atteindre 20 µg.ml⁻¹.

b) Hybridation.

Technique : on dépose les 20 µl de la sonde dénaturée sur la lame. On pose une lamelle et on laisse incuber dans une chambre humide, à 42°C, pendant 16 heures, à l'abri de la poussière.

III-5- Lavages.

But : ils servent à éliminer l'excès de sonde, les hybrides partiels et aspécifiques. Pour cela, les coupes subissent des lavages dans des conditions de stringence croissante (c'est-à-dire concentration décroissante de sels et augmentation de la température) qui assureront la dissociation des hybrides partiels et non spécifiques.

Technique : les lames sont plongées dans des bains successifs :

- 1 bain de 4XSSC (qui permet de décoller les lamelles),
- 1 bain de 1XSSC de 15 min. à température ambiante,
- 1 bain de 1XSSC de 30 min. à température ambiante,
- 1 bain de 1XSSC de 15 min. à 42°C,
- 5 - 1 bain de 1XSSC de 30 min. à 42°C,
- 1 bain de 0,1XSSC de 30 min. à 42°C.

III-6- Révélation.

Il s'agit d'une méthode indirecte faisant appel à des procédés
10 d'immunocytologie basés sur des réactions antigènes-anticorps ou ligand-
antiligand.

a) Saturation des sites tissulaires de biotine endogène.

But : ces sites sont saturés pour éviter de fixer la streptavidine
15 exogène lors de la révélation. Pour cela, on utilise les protéines du lait.

Technique : on prépare extemporanément, du tampon STMT
(Sodium-Tris-Magnésium-Tween, le Magnésium provenant de Sodipro et le
Tween de Sigma) 1mol.l⁻¹ avec 1% de lait écrémé (pH 7,5) et on rince :

- 1 rinçage d'une heure au bain-marie 37°C,
- 20 - 1 rinçage de 15 min. à température ambiante.

b) Détection de la digoxigénine.

Technique : on dépose sur chaque coupe :

- 200 µl de sérum normal de chèvre (dilué au 1/20 dans du TBS
25 de Sigma) et on laisse 30 min. à température ambiante, en chambre humide (à
l'abri de la poussière).
- 200 µl d'anticorps monoclonal anti-digoxigénine (dilué au 1/30
dans du TBS + 1% de SAB 30%) et on laisse 30 min. en chambre humide à
température ambiante.

- 30 - on rince 2 fois 5 min. dans du TBS.
- 200 µl de sérum de chèvre anti-souris biotinylée (Kit DAKO) et
on laisse 30 min., en chambre humide, à température du laboratoire.
- on rince 2 fois 5 min. dans du TBS.

- on ajoute quelques gouttes de streptavidine peroxydase biotinylée et on laisse 30 min., en chambre humide, à température du laboratoire.

- la révélation de l'activité peroxydasique est réalisée avec le
5 coffret AEC DAKO chromogène rouge, dans le noir.

- une contre-coloration à l'hémalum peut être réalisée.

c) Contrôles.

Un signal observé sur une lame nécessite la vérification avec
10 d'autres lames témoins pour affirmer la spécificité de la réponse.

Ainsi, selon les traitements effectués sur les lames, on obtient :

- traitement en l'absence de sonde : les marquages sont liés à la présence de la biotine endogène.

- traitement en présence de RNase : pas d'hybridation *in situ*.

15

RESULTATS

Dans un premier temps, la sorbine a été recherchée dans des tumeurs gastro-intestinales et pancréatiques, par immunohistochimie avec des anticorps spécifiques de la région active C-terminale de la sorbine. Les
20 tumeurs positives en immunohistochimie ont été utilisées en RT-PCR. Après extraction des ARNs et amplification, la présence de la sorbine a été confirmée par la présence d'une bande de la taille attendue et par séquençage. Les fragments considérés comme parasites et qui ne correspondaient pas à la bonne taille ont été également séquencés. Leurs séquences ne
25 correspondaient pas à la sorbine et n'avaient pas d'homologie dans les banques de données.

L'hybridation *in situ* avec des sondes de la région C-terminale montre que seulement certaines cellules endocrines expriment ce peptide à l'état normal ainsi que les couches cellulaires périphériques de certaines
30 tumeurs intestinales et pancréatiques.

Les études en immunohistochimie et en hybridation *in situ*, réalisées sur les mêmes coupes histologiques des mêmes tumeurs ont montré

une très forte corrélation des cellules endocrines exprimant la sorbine (Figure 4).

La même corrélation entre les résultats obtenus par les 2 techniques a été retrouvée dans le jéjunum humain normal (figure 5).

5 Deux formes ont en fait été obtenues par RT-PCR :

- une forme courte proche de la sorbine porcine a été obtenue
par RT-PCR sur un gros intestin humain normal ;

10 - une forme longue avec une région centrale différente de la sorbine porcine a été obtenue par RT-PCR à la fois dans un tissu de tumeur gastro-intestinale et dans un tissu normal.

Les séquences protéiques de la sorbine humaine courte et de la sorbine porcine traduites à partir des ADNc ont été comparées (figure 3).

REFERENCES

- 5 Abou El Fadil F., Sorbin in the porcine gastrointestinal tract and pancreas : an immunocytochemical analysis. *Endocrinology*, vol 138 , n° 11, 1997.
-
- 10 Charpin G., Chikh-Issa AR., Guignard H., Jourdan G., Dumas C., Pansu D., Descroix-Vagne M, Effect of sorbin on duodenal absorption of water and electrolytes in the rat. *Gastroenterology* 103:1568-1573, 1992.
- 15 Chomczynski P. and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159, 1987.
- 20 Eto B., Griesmar B., Desjeux JF. Effect of sorbin on electrolyte transport in rat and human intestine. *Am. J. Physiol.*, 1999 ; 276 (*Gastrointest. Liver. Physiol.* 39) :G107-G114.
- 25 Grishina O., Charpin G., Marquet P., Pansu D., Descroix-Vagne M. Effet des dérivés C-terminaux de la sorbine sur les flux ioniques duodénaux chez le rat. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 1995 : 19:487-93.
- Lehrach H., Diamon D., Wozney J.M. and Boedker H. RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions: a critical reexamination. *Biochemistry* . 16: 4743-4751, 1977.
- 30 Marquet F., Grishina O., Pansu D., Descroix-Vagne M., Effet des dérivés C-terminaux de la sorbine sur les flux ioniques ileaux stimulés par le VIP chez le rat. *Gastroenterol Clin. Biol.*, 1994 ; 18:702-707.

Marquet F., Botella A., Bueno L., Pansu D., Descroix-Vagne M.
Effect of sorbin derivatives on cholera toxin-induced intestinal secretion in rat *in vivo*. *Peptides* 1998 : 19:1417-1423.

5 Vagne-Descroix M., Pansu D., Jörnvall H., Carlquist M., Guignard
H., Jourdan G., Desvigne A., Collinet M., Caillet C., Mutt V., Isolation and
characterisation of porcine sorbin. *Eur. J. Biochem.* 201:53-59, 1991.

REVENDICATIONS

1. Acide nucléique codant pour un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine, ledit acide nucléique comprenant la séquence
5 nucléotidique choisie parmi :

- a) la séquence SEQ ID n° 1 ;
- b) la séquence SEQ ID n° 3 ;
- c) la séquence SEQ ID n° 5 ;
- d) une séquence nucléotidique homologue de la séquence SEQ
10 ID n° 1, n° 3 ou n° 5 ; et
- e) au moins un fragment nucléotidique desdites séquences a), b),
c) ou d).

2. Acide nucléique selon la revendication 1, ledit acide nucléique
15 comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi la séquence SEQ ID n° 6 à 8 et une séquence nucléotidique homologue de la séquence SEQ ID n° 6 à 8.

3. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant une
20 séquence nucléotidique telle que définie dans l'une des revendications 1 ou 2.

4. Cellule hôte transformée par le vecteur selon la revendication
3.

25 5. Procédé de production de peptide recombinant possédant l'activité biologique de la sorbine, ledit procédé comprenant les étapes consistant à :

i) insérer une séquence nucléotidique telle que définie dans l'une
des revendications 1 ou 2 dans un vecteur d'expression, ladite séquence
30 nucléotidique étant liée de manière opérante avec des éléments permettant la régulation de son expression ;

ii) transformer une cellule hôte avec le vecteur ainsi obtenu ;

iii) cultiver ladite cellule hôte dans des conditions permettant l'expression de ladite séquence nucléotidique ;

iv) recueillir le peptide recombinant exprimé ;

v) éventuellement purifier ledit peptide ;

5 vi) éventuellement procéder à une amidation du peptide produit.

6. Peptide recombinant isolé obtenu par le procédé selon la revendication 5.

10 7. Peptide recombinant possédant l'activité biologique de la sorbine et comprenant la séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID n° 2, SEQ ID n° 4 et SEQ ID n° 11.

15 8. Composition pharmaceutique comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 ou 2 ou un peptide selon l'une des revendications 6 ou 7.

9. Oligonucléotides comprenant les séquences SEQ ID n° 12 à SEQ ID n° 20 ou leurs séquences complémentaires.

20 10. Procédé de détection de l'expression de la sorbine dans un échantillon cellulaire ou tissulaire, comprenant les étapes consistant à:

- préparer l'ARN dudit échantillon ;

25 - mettre en contact ledit ARN obtenu avec une sonde ayant une séquence nucléotidique capable de s'hybrider spécifiquement avec un acide nucléique codant pour un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine, tel que défini à la revendication 1 ;

- détecter la présence d'ARNm hybridant avec cette sonde, indicatrice de l'expression d'un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine dans l'échantillon.

11. Procédé de détection de l'expression de la sorbine dans des cellules ou un tissu par hybridation *in situ*, comprenant les étapes consistant à:

- mettre en contact lesdites cellules ou ledit tissu avec une sonde ayant une séquence nucléotidique capable de s'hybrider spécifiquement avec un acide nucléique codant pour un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine, tel que défini dans la revendication 1 ;

- 5 - détecter la présence d'ARNm hybridant avec cette sonde, indicatrice de l'expression du peptide possédant l'activité biologique de la sorbine.
-

- 10 12. Anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé spécifiquement contre la sorbine humaine, ou fragment dudit anticorps capable de se lier spécifiquement à la sorbine humaine.

13. Procédé de détection et/ou de dosage immunologique de la sorbine humaine dans un échantillon biologique dans lequel :

- 15 i) on met en contact ledit échantillon biologique avec un anticorps tel que défini dans la revendication 12, marqué de manière détectable ;
 ii) on observe la formation d'un complexe anticorps-sorbine humaine, indicateur de la présence de sorbine humaine dans ledit échantillon.
-

LISTE DE SEQUENCES

<110> INSERM
SCRAS

<120> acides nucléiques codant pour des peptides possédant
l'activité biologique de la sorbine

<130> BFF 98/555

<140>

<141>

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 474

<212> ADN

<213> porc

<400> 1

```
atgagagcag caacaccttt gcagacagtt gaccggccga aggactggta caagaccatg 60
ttaaagcaaa tccacatggt gcacaagcca gatgatgaca cagacatgta taataactcct 120
tatacatata atgcaggcct gtacaactca ccctacagtgc ctccagtcaca tcttgcctgcc 180
aagaccaga cctacagacc cctctccaaa agccactctg acaatggcac cgacgccttt 240
aaggatgctt cctcacctgt ccctccccc catgttctc ctccagtcac acctctgcga 300
ccaagagatc ggtcttcaac agaaaagcat gactgggatc ctccagacag aaaagtggac 360
acgagaaaat ttgatcgga gccacggtct atttttgaat acgagcctgg gaagtcaccc 420
atcctgcagc acgaacgacc cgtcacgaaa ccgcaagcag ggcgccgtaa ggtc 474
```

<210> 2

<211> 153

<212> PRT

<213> porc

<220>

<221> MOD_RES

<222> (153)

<223> AMIDATION

<400> 2

```
Met Arg Ala Ala Thr Pro Leu Gln Thr Val Asp Arg Pro Lys Asp Trp
  1           5           10           15
```

```
Tyr Lys Thr Met Phe Lys Gln Ile His Met Val His Lys Pro Asp Asp
      20           25           30
```

```
Asp Thr Asp Met Tyr Asn Thr Pro Tyr Thr Tyr Asn Ala Gly Leu Tyr
  35           40           45
```

```
Asn Ser Pro Tyr Ser Ala Gln Ser His Pro Ala Ala Lys Thr Gln Thr
  50           55           60
```

```
Tyr Arg Pro Leu Ser Lys Ser His Ser Asp Asn Gly Thr Asp Ala Phe
  65           70           75           80
```

```
Lys Asp Ala Ser Ser Pro Val Pro Pro Pro His Val Pro Pro Pro Val
```


85 90 95

Pro Pro Leu Arg Pro Arg Asp Arg Ser Ser Thr Glu Lys His Asp Trp
100 105 110

Asp Pro Pro Asp Arg Lys Val Asp Thr Arg Lys Phe Arg Ser Glu Pro
115 120 125

Arg Ser Ile Phe Glu Tyr Glu Pro Gly Lys Ser Ser Ile Leu Gln His
130 135 140

Glu Arg Pro Val Thr Lys Pro Gln Ala
145 150

<210> 3
<211> 492
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 3
atgaaagcaa caacaccttt gcagacagtc gaccggccca aggactggta caagacgatg 60
tttaagcaaa ttcacatggt gcacaagccg gatgatgaca cagacatgta taatactcct 120
acacctcaca tgaaatatac atacaatgca ggtctgtaca acccacccta cagtgtctcag 180
tcacaccctg ctgcaaagac ccaaacctac agacctcttt ccaaagcca ctccgacaac 240
agccccaatg cctttaagga tgcgtcctcc ccagtgcctc ccccatgtg tccacctcca 300
gtcccgccgc ttcgaccaag agatcggtct tcaacagaaa agcatgactg ggatcctcca 360
gacagaaaag tggacacaag aaatttcggg tctgagccaa ggagtatttt tgaatacgag 420
cctgggaagt catccatcct gcagcacgaa cgaccctgca cgaaaccgca agcagggcgc 480
cgtgataagt cc 492

<210> 4
<211> 158
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (158)
<223> AMIDATION

<400> 4
Met Lys Ala Thr Thr Pro Leu Gln Thr Val Asp Arg Pro Lys Asp Trp
1 5 10 15

Tyr Lys Thr Met Phe Lys Gln Ile His Met Val His Lys Pro Asp Asp
20 25 30

Asp Thr Asp Met Tyr Asn Thr Pro Thr Pro His Met Lys Tyr Thr Tyr
35 40 45

Asn Ala Gly Leu Tyr Asn Pro Pro Tyr Ser Ala Gln Ser His Pro Ala
50 55 60

Ala Lys Thr Gln Thr Tyr Arg Pro Leu Ser Lys Ser His Ser Asp Asn
65 70 75 80

Ser Pro Asn Ala Phe Lys Asp Ala Ser Ser Pro Val Pro Pro Pro His

85 90 95

Val Pro Pro Pro Val Pro Pro Leu Arg Pro Arg Asp Arg Ser Ser Thr
100 105 110

Glu Lys His Asp Trp Asp Pro Pro Arg Lys Val Asp Thr Arg Asn
115 120 125

Phe Gly Ser Glu Pro Arg Ser Ile Phe Glu Tyr Glu Pro Gly Lys Ser
130 135 140

~~Ser Ile Leu Gln His Glu Arg Pro Val Thr Lys Pro Gln Ala~~
145 150 155

<210> 5
 <211> 1794
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 5

atgaaagcaa	caacaccttt	gcagacagtc	gaccggccca	aggactggta	caagacgatg	60
tttaagcaaa	ttcacatggg	gcacaagccg	gatgatgaca	cagacatgta	taatactcct	120
acacctcaca	tgaaatatac	atacaatgca	ggctctgtaca	acccacccta	cagtgtctcag	180
tcacaccctg	ctgcaaagac	ccaaacctac	agacctcttt	ccaaaagcca	ctccgacaac	240
agccccaatg	cctttaagga	tgcgtcctcc	ccagtgcctc	ccccacatgt	tccacctcca	300
gtcccgccgc	ttcgaccaag	agatcggtct	tcaacagaaa	agcatgactg	ggatcctcca	360
gacagaaaag	tggacacaag	aaatttcggg	tctgagccaa	ggagtatttt	tgaatacgag	420
cctgggaagt	catccatcct	gcagcacgaa	cgacctctct	accagtcttc	catagacaga	480
agcttggaaa	gaccagcag	ctctgcaagc	atggcgggtg	actttagaaa	acggaggaag	540
agtgaacctg	cagtgggccc	gcccaggggc	ttgggggatc	acagttcaag	caggaccagc	600
cccgcccg	cagacctccc	aggatcaagt	tccaccttta	ccacgtcttt	cattagttct	660
tctccttct	ctccctcgag	agcacaaggt	gggatgata	gcaaaatgtg	tccgcccctt	720
tgcagttact	cggggctcaa	tggctcgccc	tctagttagt	tagagtgtg	cggcgcttat	780
agaaggcact	tggagctccc	ccaggactct	caaagggcc	tcactttcaa	gaacggctgg	840
caaatggccc	ggcaaaatgc	agagatctgg	agtagcactg	aagaggcggt	ttccccaaa	900
atcaaatcac	gaagctgtga	cgatctcctg	aatgatgact	gcggcagctt	cccagaccct	960
aaaaccaagt	cagaaagcat	gggttctctg	ttatgtgacg	aaggctccaa	agagagcgac	1020
cccatgacgt	ggacttcccc	ctacatcccc	gaagtgtg	ggaacagcag	agaattcatg	1080
tttaagcaaa	tggatattcg	tggaatctct	ggatggagga	ccattttgga	aagtgtctaaa	1140
ggaatatcta	taatgagtga	ggaatctatg	agaaagatgt	aaagtgtgta	acgtaaattt	1200
tttggtttag	tagatgatca	ctgattttaa	tgtataacag	agtagatgcc	ccccccctca	1260
aaaacgcata	acccccccct	taccctgaca	tttagctttg	aatatgcaca	aaatagtttg	1320
tgggtagaat	agaacctat	gtctgaaagt	atatgtgttg	ggatttcatc	ccatatatgg	1380
tggtagccgc	caactcagag	ataggctcgt	ctgttagatt	ctcacaacaa	aaatgtataa	1440
cacaagcttg	aattcatggt	taagcaaata	aaaataatgt	gggagactgg	acagaggtca	1500
gggacccag	ggtgccaaagt	gtagctcaga	gtcaccattg	gtgaatcgct	tcattctccat	1560
gtggaactaa	atgcaactaa	gtgatttctt	aggctttccc	cagtcattct	tagtgaaaat	1620
atggacttcc	cacatcaatt	ctgagtcact	ttcttcccac	ctggaatgat	taccattttt	1680
ctcatagtca	gtgtatgcag	cagcatatac	cctcatttgc	ctttgggtac	attcctgagt	1740
caaatgtat	aacacaaggt	cacgaaaccg	caagcagggc	gccgtgataa	gtcc	1794

<210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 6

cccgtcacga aaccgcaagc a

21

<210> 7
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 cacgaacgac ccgtcacgaa accgcaagca

30

<210> 8
 <211> 120
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 cctccagaca gaaaagtgga cacaagaaat ttcgggtctg agccaaggag tatttttgaa 60
 tacgagcctg ggaagtcac catcctgcag cacgaacgac ccgtcacgaa accgcaagca 120

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)
 <223> AMIDATION

<400> 9
 Pro Val Thr Lys Pro Gln Ala
 1 5

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)
 <223> AMIDATION

<400> 10
 His Glu Arg Pro Val Thr Lys Pro Gln Ala
 1 5 10

<210> 11
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<221> MOD_RES
 <222> (40)
 <223> AMIDATION

<400> 11
 Pro Pro Asp Arg Lys Val Asp Thr Arg Asn Phe Gly Ser Glu Pro Arg
 1 5 10 15
 Ser Ile Phe Glu Tyr Glu Pro Gly Lys Ser Ser Ile Leu Gln His Glu
 20 25 30

Arg Pro Val Thr Lys Pro Gln Ala
 35 40

<210> 12
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: amorces
 utilisées pour les RT-PCR

<400> 12
 aargayacnt ayaarac

17

<210> 13
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: amorces
 utilisées pour les RT-PCR

<400> 13
 cggccgaagg actggtta

17

<210> 14
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: amorces
 utilisées pour les RT-PCR

<400> 14
 acaagccgag atgatgac

18

<210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: amorces
 utilisées pour les RT-PCR

<400> 15
 gtcttcaaca gaaaagcatg ac 22

<210> 16
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: amorces
 utilisées pour les RT-PCR

<400> 16
 ggncgytcrt gytgyag 17

<210> 17
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: amorces
 utilisées pour les RT-PCR

<400> 17
 ggatcccagt catgctt 17

<210> 18
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: amorces
 utilisées pour les RT-PCR

<400> 18
 tggatgactt cccaggc 17

<210> 19
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: amorces
 utilisées pour les RT-PCR

<400> 19
 gggtcgttcg tgctgcagga tggatgactt cccaggctcg tattcaaa 48

<210> 20
<211> 21
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorces
utilisées pour les RT-PCR

<400> 20
tgcttgcggt ttcgtgacgg g

21

1/5

MRAATPLQTVDRPKDWYKTMFKQIHMVHKPDDDDTMYNTPYTYNAGLYNSPYSAQSHPA
 MRAATPLQTVDRPKD YKTMFKQIHMVHKPDDDDT MYNTPYTYNAGLYNSPYSAQSHPA
 MRAATPLQTVDRPKD TYKTMFKQIHMVHKPDDDDTKMYNTPYTYNAGLYNSPYSAQSHPA

KTQTYRPLSKSHSDNGTDAFKDASSVPPPHVPPVPLRPRDRSSTEKHDWDPPDRKVD
 KTQTYRPLSKSHSDNGTDAFKDASSVPPPHVPPVPLRPRDRSSTEKHD DPPDRKVD
 KTQTYRPLSKSHSDNGTDAFKDASSVPPPHVPPVPLRPRDRSSTEKHDRDPPDRKVD

TRKFRSEPRSFIEYEPGKSSILQHERPVTKPQA-NH₂
 TRKFRSEPRSFIEYEPGKSSILQHERPVTKPQA-NH₂
 TRKFRSEPRSFIEYEPGKSSILQHERPVTKPQA-NH₂

FIG.1

ATGAGAGCAGCAACACCTTTGCAGACAGTTGACCGGCCGAAGGACTGGTACAAGACCATGTTTAAGCAAA
 IIII IIII IIIIIIIIIIIIIIIIIII IIIIIII IIIIIIIIIIIIIIIIIII IIIIIIIIIII
 ATGAAAGCAACAACACCTTTGCAGACAGTCGACCGGCCAAGGACTGGTACAAGACCATGTTTAAGCAAA

TCCACATGGTGACAAGCCAGATGATGACACAGACATGTATAATACTCCT TATAC
 I IIIIIIIIIIIIIIIIIII IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII IIIII
 TTCACATGGTGACAAGCCGATGATGACACAGACATGTATAATACTCCTACACCTCACATGAAATATAC

ATATAATGCAGGCCTGTACAACTCACCTACAGTGCTCAGTCACATCCTGCTGCCAAGACCCAGACCTAC
 III IIIIIII IIIIIIIII IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII IIIIIII IIIIIII IIIII
 ATACAATGCAGGTCTGTACAACCCACCTACAGTGCTCAGTCACACCCTGCTGCAAAGACCCAAACCTAC

AGACCCCTCTCCAAAAGCCACTCTGACAATGGCACCGACGCCTTTAAGGATGCTTCCTCACCTGTCCCTC
 IIIII II IIIIIIIIIIIIIII IIIII II II I IIIIIIIIIIIIIII IIIII II II IIII
 AGACCTCTTTCCAAAAGCCACTCCGACAACAGCCCCAATGCCTTTAAGGATGCGTCCTCCCCAGTGCCTC

CCCCACATGTTCCCTCCTCCAGTCCCACCTCTGCGACCAAGAGATCGGTCTTCAACAGAAAAGCATGACTG
 IIIIIIIIIIIII IIIIIIIIIII II II IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII
 CCCCACATGTTCCACCTCCAGTCCCGCGCTTCGACCAAGAGATCGGTCTTCAACAGAAAAGCATGACTG

GGATCCTCCAGACAGAAAAGTGGACACGAGAAAATTTGATCGGAGCCACGGTCTATTTTTGAATACGAG
 IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII IIIII II I II IIIII II IIIIIIIIIIIIIIIII
 GGATCCTCCAGACAGAAAAGTGGACACAAGAAATTTGCGGTCTGAGCCAAGGAGTATTTTTGAATACGAG

CCTGGGAAGTCATCCATCCTGCAGCACGAACGACCCGTCACGAAACCGCAAGCAGGGCGCCGTAAGGTC
 III I
 CCTGGGAAGTCATCCATCCTGCAGCACGAACGACCCGTCACGAAACCGCAAGCAGGGCGCCGTAAGTCC

FIG.2

2/5

MKATTPLQTVDRPKDWYKTMFKQIHMVHKPDDDDTDMYNTPTPHMKYTYNAGLYNPPYSAQ
M+A TPLQTVDRPKDWYKTMFKQIHMVHKPDDDDTDMYNTP YTYNAGLYN PYS AQ
MRAATPLQTVDRPKDWYKTMFKQIHMVHKPDDDDTDMYNTP-----YTYNAGLYNSPYS AQ

SHPAAKTQTYRPLSKSHSDNSPNAFKDASSPVPPPHVPPPVPLRPRDRSSTEKHDWDPP
SHPAAKTQTYRPLSKSHSDN +AFKDASSPVPPPHVPPPVPLRPRDRSSTEKHDWDPP
SHPAAKTQTYRPLSKSHSDNGTDAFKDASSPVPPPHVPPPVPLRPRDRSSTEKHDWDPP

DRKVDTRNFGSEPRSIFEYEPGKSSILQHERPVTKPQA-NH₂
DRKVDTR F SEPRSIFEYEPGKSSILQHERPVTKPQA-NH₂
DRKVDTRKFRSEPRSIFEYEPGKSSILQHERPVTKPQA-NH₂

FIG.3

3/5

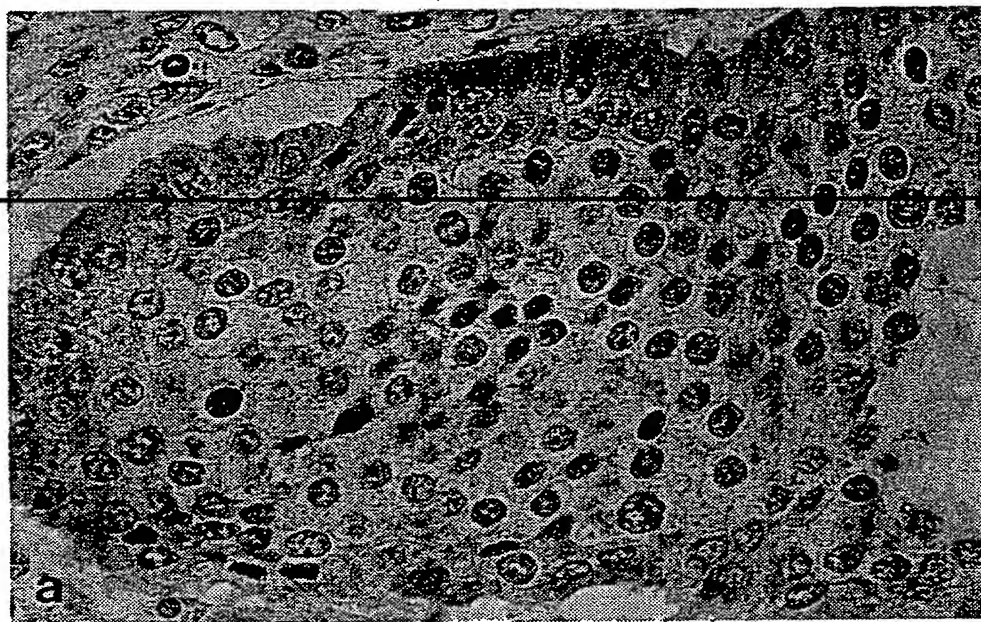


FIG.4A

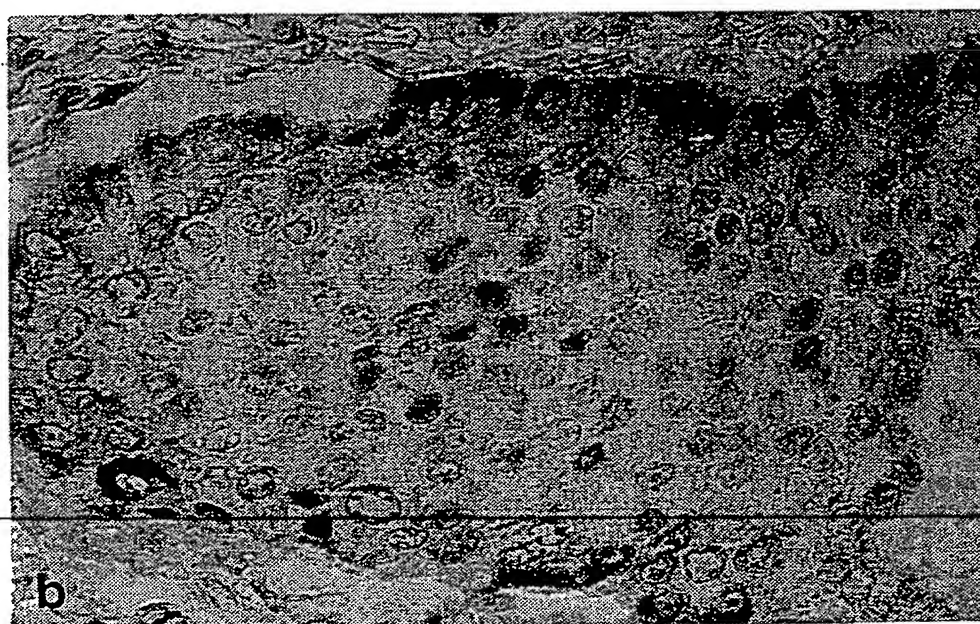


FIG.4B

4/5

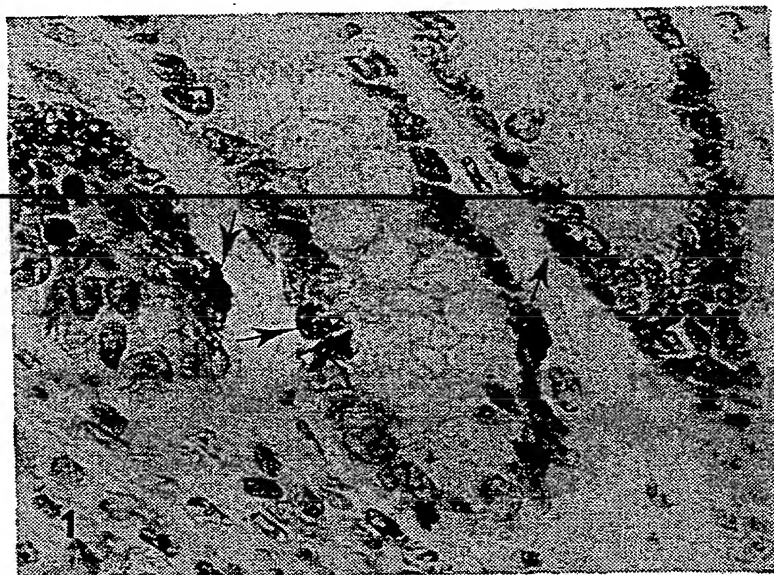


FIG.5A

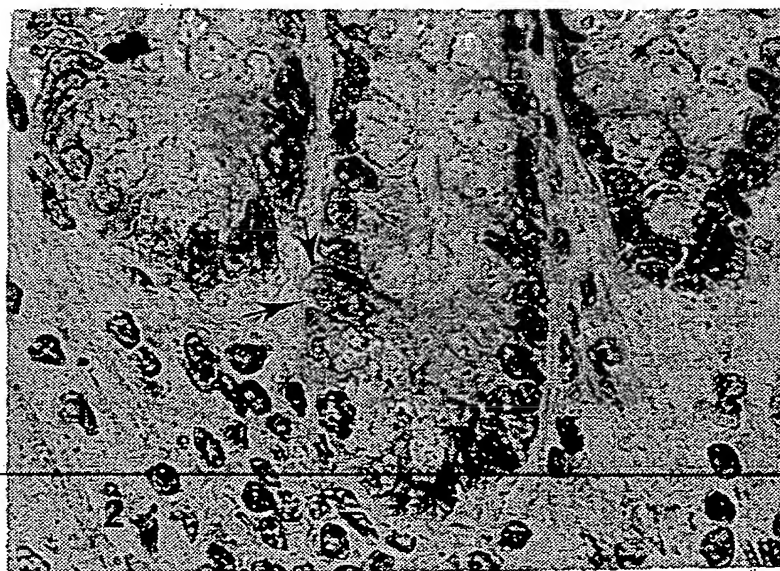


FIG.5B

5/5

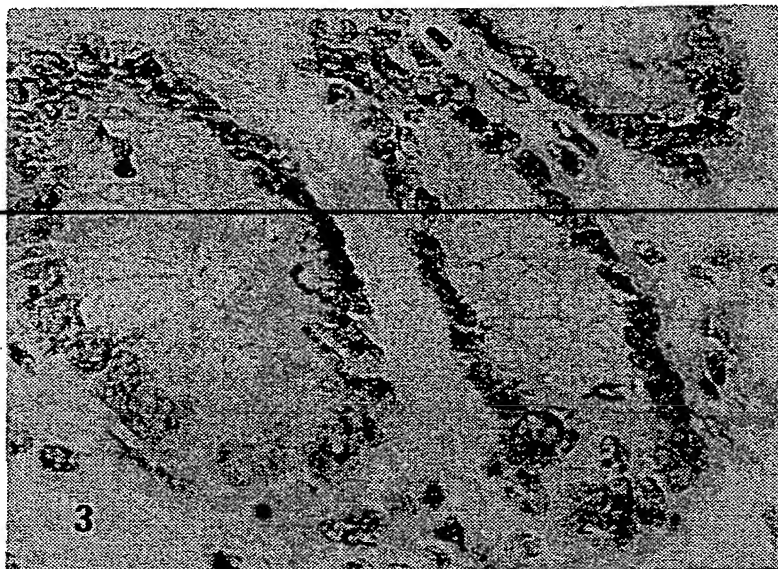


FIG.5C

